植 物 分 类 学 报 45 (4): 505–512 (2007) doi:10.1360/aps06124
Acta Phytotaxonomica Sinica http://www.plantsystematics.com

华北落叶松小孢子母细胞(PMC)减数分裂和花粉的发育

[1]张守攻 [1]杨文华 [2]李懋学 [3]韩素英 [1]王建华 [1]孙晓梅 [1]王笑山 [1]齐力旺*
[1](中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)
[2](北京大学生命科学学院 北京 100871)
[3](中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所重点实验室 北京 100091)

Studies on the pollen mother cell meiosis and pollen development of *Larix principis-rupprechtii*

[1]ZHANG Shou-Gong [1]YANG Wen-Hua [2]LI Mao-Xue [3]HAN Su-Ying [1]WANG Jian-Hua [1]SUN Xiao-Mei [1]WANG Xiao-Shan [1]QI Li-Wang*
[1](*Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry*, Beijing 100091, China)
[2](*College of Life Sciences, Peking University*, Beijing 100871, China)
[3](*Key Laboratory of Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry*, Beijing 100091, China)

Abstract Using the squash method for chromosomes, cytological characters in pollen mother cells (PMC) and pollen development traits of *Larix principis-rupprechtii* were investigated. Our results showed that the PMC meiosis of *L. principis-rupprechtii* began in autumn, remained at the diffuse diplotene stage through the dormancy of the plant during winter and re-started the next spring to complete the process. It is mainly characterized by the lack of synchronization of meiosis in the same anther and by the relatively quick processes of every meiosis stage. After the re-start of meiosis, all the PMCs reached the tetrad stage within three days. The main configuration of bivalents were rings caused by more than two chromosome exchanges on the arms. Rod-bivalents produced by chromosome exchange on only one arm were rarely observed in a few cells. The average configuration was 10.62II+1.38I. Of meiosis Metaphase II, there were patterns of parallel or perpendicularity, forming eudipleural or tetrahedral tetrads, which are also the major tetrad types in the monocots and dicots. After one week at the tetrad stage, callose cell walls started to dissolve, then the four cells separated, and dispersed into the pollen cell, forming independent single-nucleus pollen grains. Afterwards, the haploid nucleolus underwent further cycles of mitotic division, resulting in the formation of five-celled pollen with two prothallial cells, one tube cell, one stalk cell and one body cell.

Key words *Larix principis-rupprechtii*, meiosis, pollen mother cell (PMC), pollen development, chromosome.

2006-08-14 收稿, 2007-01-23 收修改稿。
基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”)项目(2006AA100109); 国家转基因与产业化专项 (J2002-B-005, JY03-B-28-02); 国家自然科学基金(30571517); 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD01A14, 2006BAD01A16)资助 (Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), Grant No. 2006AA100109; the National Transgenic Plants and Industrialization Program, Grant Nos. J2002-B-005 and JY03-B-28-02; the National Natural Science Foundation of China, Grant No. 30571517; and the National “Eleventh Five-Year Programme” of China, Grant Nos. 2006BAD01A14, 2006BAD01A16)。
* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: lwqi@caf.ac.cn; Tel.: 86-10-62888445; Fax: 86-10-62872015)。

摘要 采用染色体压片法系统地观察了华北落叶松*Larix principis-rupprechtii*小孢子母细胞 (PMC) 减数分裂的细胞学特征和花粉发育过程。结果表明: 华北落叶松PMC减数分裂始于当年秋季, 以弥散双线期的特殊状态休眠越冬, 次年春天又重新恢复其后续的减数分裂过程。主要特点是在同一花药中, 减数分裂不同步, 且各阶段分裂速度较快, 3天内全部停留在四分体阶段; 二价体构型主要为两臂共发生过两次以上交换的环形二价体, 少数细胞中偶见一臂发生交换的棒状二价体; 其平均构型为10.62II+1.38II; 中期II核分裂相既有平行式样, 又有互为垂直式样, 形成左右对称型和四面体型四分体, 兼具单、双子叶植物四分体主要类型特点。四分体持续一周后, 细胞壁开始溶解, 4个小孢子分离并游离在药室中, 成为独立的单核花粉。其后细胞核开始有丝分裂, 最后形成由2个原叶细胞、1个管细胞、1个柄细胞和1个体细胞共5个细胞组成的成熟花粉。此外, 还观察到成熟花粉当中有13.6%是由4个细胞组成的。

关键词 华北落叶松; 减数分裂; 小孢子母细胞; 花粉发育; 染色体

华北落叶松*Larix principis-rupprechtii* Mayr是我国亚高山地区非常重要的用材和生态造林树种, 在工业用材和生态环境保护、防止水土流失等方面占有非常重要的位置, 栽培面积已超过15万hm^2。"十 •五"以来, 我国已分别对华北落叶松、日本落叶松*L. kaempferi* (Lamb.) Carr.、长白落叶松*L. olgensis* Henry、兴安落叶松*L. gmelinii* (Rupr.) Rupr.以及杂种落叶松开展了系统的遗传育种与改良研究, 选育出了适于不同地域生长的优良杂种无性系, 培育出一批生长快、抗逆性强的新品系。研究证实落叶松种间杂交确有巨大的利用潜力。为此, 如何能准确预测、调控和利用高质量、高生命力的落叶松花粉, 探索其减数分裂过程和花粉发育机制, 进一步揭示与利用落叶松杂种优势机理, 成为落叶松遗传育种研究者迫在眉睫的任务。长期以来, 在育种和造林实践中, 一直困扰人们的一个主要问题是结实率较低(为30%–40%)(贾桂霞, 沈熙环, 2001)。前人(Christiansen, 1960; Ekberg et al., 1967; Villar et al., 1984; Owens et al., 1993; 贾桂霞, 沈熙环, 2001) 虽然对落叶松传粉时间、传粉空间分布、外界环境条件的影响以及人工控制授粉等方面进行了研究, 但有关花粉生物学本身的研究仍然不足, 而PMC减数分裂中的染色体数目、结构和行为的变异往往是影响花粉发育和育性的本质问题。本文在前人工作的基础上, 再进行系统的补充研究与观察。这些研究对落叶松的遗传育种和系统演化研究均具有重要的科学意义和应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

华北落叶松小孢子叶球采自河北承德孟滦林局查字落叶松种子园9株20年生植株。采集时间分为3个阶段: 2004年9月8日至10月15日, 每周采2次小孢子叶球; 2005年3月23日至4月15日, 每天采1次。每次每株大约采20个小孢子叶球, 当即用卡诺氏固定液固定, 24 h后换入95%乙醇中保存备用。2005年4月16日至30日, 所采小孢子叶球为室内水培枝条上, 每隔1天采1次, 每次大约采20个小孢子叶球, 固定和保存方法同上。此外, 为了观察和核实授粉前成熟花粉核的数目, 2005年4月底, 从该种子园中上述植株上收集成熟的花粉, 平均每株取约1 g花粉混合后, 随机取样进行观察。

1.2　方法

PMC减数分裂用卡宝品红(Carbol fuchsin)染色和压片。花粉发育用铁矾-苏木精染色, 用45%乙酸分色和压片。为了更准确显示花粉中核的结构, 成熟花粉改用孚尔根整体染色法和银染法。详细参照李懋学和张敦方(1991)的方法。

2　观察结果

2.1　减数分裂

华北落叶松PMC减数分裂过程主要有以下特点。

2.1.1　休眠越冬　华北落叶松PMC减数分裂于每年秋季启动, 9月上旬采集的小孢子叶球已进入细线和偶线期(图1); 9月中下旬, 已完全进入双线期(图2, 3)。在进入双线期之初, 着色深浅不同的双线期分裂相混合出现在同一张制片中; 随后, 所有双线期二价体变为着色浅淡、构型模糊不清的弥散双线期(diffuse diplotene), 表明减数分裂过程暂停而进入冬季休眠。至次年春天, 约3月下旬至4月上旬, 重新恢复减数分裂的后续过程, 其明显标志是双线期恢复正常深染状态, 二价体构型和交叉结又变得清晰可辨(图4), 很快便进入后续的终变期(图5, 6)和中期I (图7, 8)。此外, 我们还注意到在春天采集的小孢子叶球中, 有部分小孢子叶球的花粉母细胞完全败育和解体, 细胞学检查只见剩下一团不着色的皱缩的细胞壁残留物。

2.1.2　持续时间　如果从春天重新恢复后续分裂过程计算, 华北落叶松PMC减数分裂过程的持续时间只有几天。最初, 弥散的双线期由浅着色状态变为深着色状态, 并且很快进入终变期, 在终变期停留很短时间便进入中期I, 随即进入后期、末期I。在同一花药中, 几乎可以见到从双线期到末期I的所有分裂相, 可见其分裂极不同步, 但是又均可在1天内完成第1次分裂。在第2天检查的小孢子叶球中, 几乎很少见到第1次分裂的图像, 普遍见到的是从分裂间期至末期II的第2次分裂的图像(图11–17); 至第3–4天, 即全都停留在四分体阶段。

2.1.3　二价体　从终变期和中期I (图5–8)的二价体构型看, 绝大部分表现为两臂共发生过两次或两次以上交换的环形二价体, 少数细胞中偶见只一臂发生过交换的棒状二价体(图8), 这与其具有较大(8–16 μm)的中部着丝粒和亚中部着丝粒染色体有关(张敦方等, 1985)。减数分裂中期I染色体价体的平均构型为10.62II+1.38I。从二价体构型的比例来看每个母细胞的染色体交换频率是比较高的, 这是华北落叶松种内变异的重要来源。

2.1.4　四分体　从中期II两个核分裂相在赤道面的取向上看, 它们之间既有平行式样(图13), 又有互为垂直的式样(图14)。因而最终形成的四分体在构型上也有所不同, 前者将形成左右对称型的四分体(图18, 19), 后者将形成四面体型的四分体, 这种类型的四分体通常在平面图中只能看到其中的3个(图20)。

2.2　花粉发育

2.2.1　发育过程　根据一个基本上适用于各类裸子植物雄配子体发育的程序和命名系统(Singh, 1978; Moitra & Bhatnagar, 1982), 华北落叶松花粉的发育及其细胞的命名如下:

单核小孢子分裂(图21–23)产生1个中央细胞(center cell)和第1个原叶细胞(prothallial

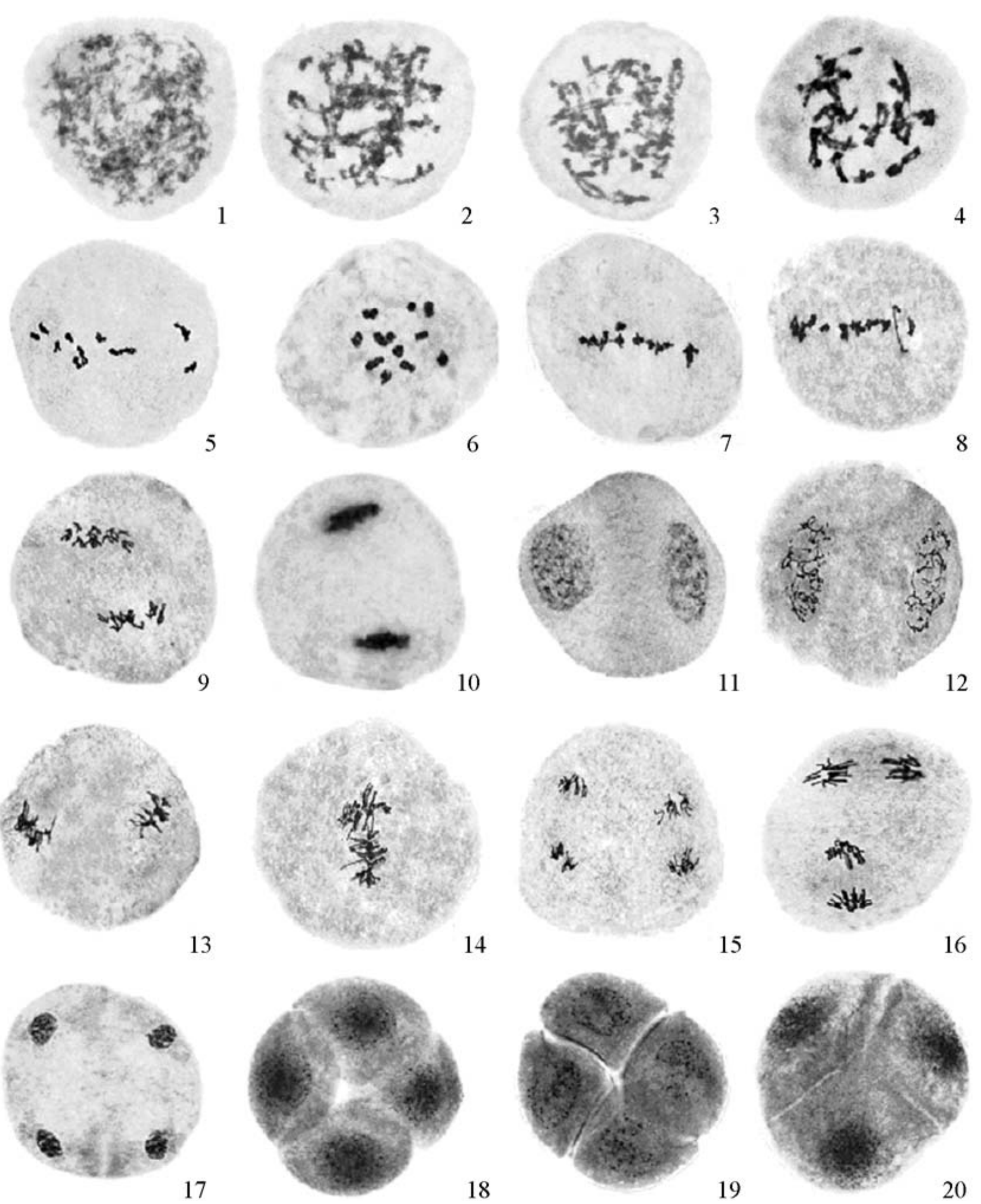


图1–20 减数分裂 **1.** 偶线期。**2.** 双线期(早)。**3.** 弥散双线期。**4.** 正常双线期。**5.** 终变期(早)。**6.** 终变期(晚)。**7, 8.** 中期I; **9.** 后期I。**10.** 末期I。**11.** 分裂间期。**12.** 前期II。**13, 14.** 中期II。**15, 16.** 后期II。**17.** 末期II。**18.** 四分体。**19.** 左 右对称四分体。**20.** 四面体四分体。

Figs. 1–20. Meiosis of *Larix principis-rupprechtii*. **1.** Zygotene. **2.** Early diplotene . **3.** Diffuse diplotene. **4.** Normal diplotene. **5.** Early diakinesis. **6.** Late diakinesis. **7, 8.** Metaphase I. **9.** Anaphase I. **10.** Telophase I. **11.** Meiosis interphase. **12.** Prophase I. **13, 14.** Metaphase II. **15, 16.** Anaphase II. **17.** Telophase II. **18.** Tetrad. **19.** Eudipleural tetrad. **20.** Tetrahedral tetrad.

cell), 该原叶细胞移至贴近小孢子壁, 细胞核由圆形变为扁平, 显示退化(图24, 25)。之后, 中央细胞分裂, 产生第2个原叶细胞和1个精子器原始细胞(antheridial initial)(图26–28) 精子器原始细胞分裂, 产生1个管细胞(tube cell)和1个精子器细胞(antheridial cell)(图29, 30)。精子器细胞再分裂一次, 产生1个柄细胞(stalk cell)和1个体细胞(body cell)。最后的成熟花粉包含2个原叶细胞、1个管细胞、1个柄细胞和1个体细胞, 共5个细胞(图31)。授粉后, 在花粉管中, 体细胞分裂, 产生2个雄配子体(精子)。

根据我们对500个成熟花粉的观察统计, 含五细胞的花粉占86.4%, 四细胞的花粉占13.6%, 推测它们可能是败育花粉。此外, 还观察到, 当用孚尔根染色法染色成熟花粉时, 除原叶细胞深染外, 其他细胞均染色极淡或不染色, 这一结果与Moitra (1980)在松属*Pinus* L.中观察到雄配子体的雄核均呈孚尔根负反应类似。

2.2.2　原叶细胞的定位　我们在2005年和2006年分别将华北落叶松成熟花粉水培4 h左右, 用卡宝品红、孚尔根染色法和银染法, 观察成熟花粉的发育状况。通过大量观察发现, 落叶松花粉的萌发孔有可能是2个原叶细胞所在之处(图32–34), 从图中明显可见2个退化的原叶细胞, 有如双层盖子封住萌发孔。在培养条件下, 花粉粒明显吸水膨胀, 两原叶细胞被顶开, 精原细胞从萌发孔溢出。关于萌发孔的真实情况, 留待后续的受精生物学研究。

此外, 我们还观察到极少数花粉中的原叶细胞发生错位现象(图35–38), 即不像大多数正常花粉那样2个原叶细胞互相重叠在一起, 而是错位分离的。这种错位是否暗示这类花粉可能有两个萌发孔, 亦或是被动位移造成的, 尚不清楚。

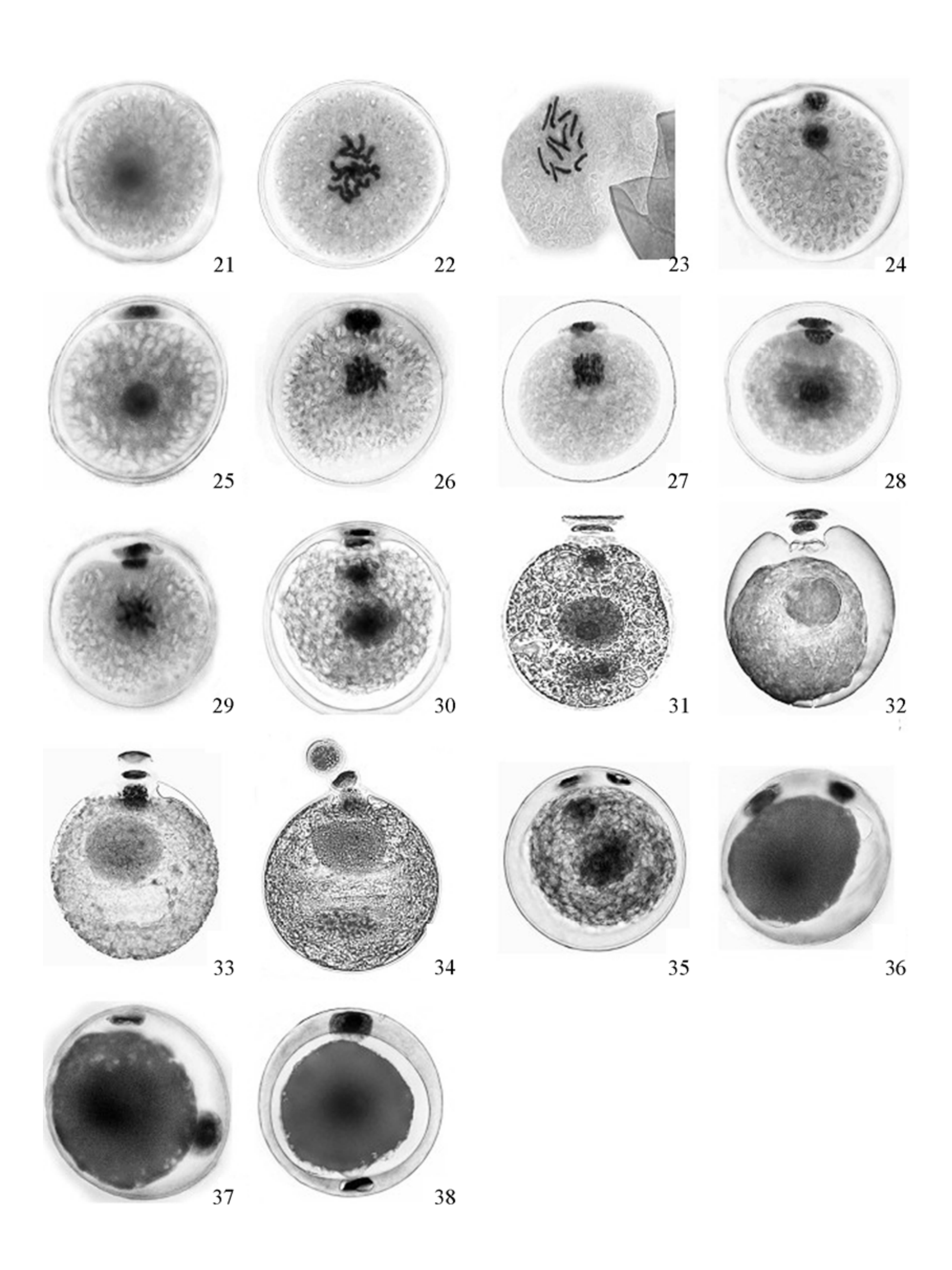
3　讨论

3.1　减数分裂休眠越冬

华北落叶松PMC减数分裂过程始于每年秋季, 以弥散双线期的特殊状态休眠越冬, 次年春天又恢复其后续的分裂过程。已报道的其他几种落叶松的PMC减数分裂也都有此现象(Ekberg et al., 1967; Owens & Molder, 1971; 俞晓敏, 赵桂仿, 2003), 由此可认为这可能是落叶松属*Larix* Mill.共有的特征。在讨论松科Pinaceae的系统演化中, 可能更具鉴别性价值。

3.2　减数分裂异常现象

植物的细胞分裂活动对温度都特别敏感, 减数分裂尤甚。Ekberg等(1967)的系统观察表明, 其减数分裂的花粉母细胞能否安全越冬, 会受到休眠前气温变化的影响, 如果已启动减数分裂的秋天气温偏高, 其分裂活动将不会停止于双线期而进入休眠, 而是会快速继续分裂及至形成四分体, 随即这些四分体又进行一次非正常的细胞分裂, 形成八分体, 这种无功能的产物只能走向败育。这种高温诱导的“自杀”行为, 反映了调控减数分裂过程的基因完全失控。反之, 如果秋天已启动减数分裂, 在未进入弥散双线期休眠之前, 出现骤然降温或霜冻早来, 正处于减数分裂的母细胞便很易遭受冻害而死亡。Ekberg等(1967)对生长于瑞典4个不同地点的3种落叶松的观察和统计显示: 败育花粉的百分率最低分别是17.2%、20.3%和35.5%, 最高分别是52%、81.6%和87%, 因地区不同而异。值


21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

得注意的是, 该作者指出, 最普遍出现的是整个小孢子叶球的败育, 可见其败育是由不正常的减数分裂引起的, 而由减数分裂异常现象导致的败育是不可逆的完全败育。因此, 我们认为, 这可能是落叶松花粉败育率较高而结实率偏低的主要内因。

3.3　五细胞花粉

经花粉发育过程的详细观察, 可以确认成熟的落叶松花粉是由五细胞组成, 即2个退化的原叶细胞、1个管细胞、1个柄细胞和1个体细胞。这一基本结构与松科其他属(松属、黄杉属*Pseudotsuga* Carr.、油杉属*Keteleeria* Carr.)的花粉完全不同(Mergen et al., 1963; Sterling, 1963; Favre-Duchartre, 1970; Singh, 1978; 王伏雄, 1978)。从花粉的基本结构特征而言, 五细胞花粉作为落叶松属与四细胞花粉的松科其他属的鉴别标志, 在系统分类上也具有重要的价值。

3.4　PMC减数分裂和花粉发育中的细胞生物学变异的适应价值

从落叶松的化石研究(Schorn, 1994)已知, 落叶松属在系统演化上是一个年轻的属, 分布于北极圈两侧、温带和寒温带山区(杨书文等, 1994), 为了适应其严寒的气候环境, 其生物学特性必然有某些不同于其他松科植物的变异, 例如花粉不具翅, 减数分裂的冬季休眠以及五细胞花粉的结构等, 可能都与自然选择的调节有关。此外, 落叶松的花粉无翅, 这一特性可以限制其传粉的空间范围, 在恶劣条件下, 可以保证有一定比例的自交结实率。例如, 日本落叶松和千岛落叶松*L. kamtschatica* (Rupr.) Carr.开放授粉时, 其自交结实率可分别达到50%和70% (杨书文等, 1994)。

综上所述, 落叶松这些细胞生物学上存在的变异, 表明其至今仍处于适应其生存环境的过程中。这是其自保生存的适应策略, 也是其败育花粉较多和结实率偏低的重要原因。

参　考　文　献

Christiansen H. 1960. On the effect of low temperature on meiosis and pollen fertility in *Larix deciduas* Mill. Silvae Genetica 9: 72–78.

Ekberg I, Eriksson G, Sulikova Z. 1967. Meiosis and pollen formation in *Larix*. Hereditas 59: 427–437.

Favre-Duchartre M. 1970. Des Ovules aux Graines. Paris: Istom-Port.

Jia G-X (贾桂霞), Li F-L (李凤兰), Shen X-H (沈熙环). 1994. Development of male and female gametophytes and of embryo in *Larix principis-rupprechtii* Mayr. Journal of Beijing Forestry University (北京林业大学学报) 16 (2): 10–14.

←

图21–38　花粉发育　**21.** 单核花粉。**22, 23.** 单核花粉分裂。**24.** 二细胞花粉, 示第一原叶细胞位移和退化。**25, 26.** 二细胞花粉中一细胞核分裂。**27.** 刚形成的三细胞花粉。**28.** 三细胞花粉,二原叶细胞重叠并开始退化。**29.** 三细胞花粉, 一细胞核分裂。**30.** 刚形成的四细胞花粉。**31.** 成熟的5细胞花粉,包含扁平退化的2个原叶细胞, 1个管细胞、1个柄细胞和1个体细胞。**32–34.** 人工培养三天的成熟花粉, 示原叶细胞和萌发孔的关系。**35–38.** 示两个原叶细胞的位置变异。

Figs. 21–38. Pollen development of *Larix principis-rupprechtii*. **21.** Single-nucleus pollen. **22, 23.** Single-nucleus pollen divided. **24.** Two-celled pollen, showing the displacement and degeneration of the first prothallial cell. **25, 26.** Two-celled pollen, showing one of the nucleus dividing. **27.** Three-celled pollen, just shaped. **28.** Three-celled pollen, showing two prothallial cells overlapped and starting to degenerate. **29.** Three-celled pollen, showing one of the nucleus dividing. **30.** Four-celled pollen, just shaped. **31.** Mature five-celled pollen containing two flat prothallial cells, one tube cell, one stalk cell, and one body cell. **32–34.** Mature pollen that has been artificially cultured for three days, showing the relationship between the prothallial cell and the aperture. **35–38.** Showing different location of the two prothallial cells.

Li M-X (李懋学), Zhang X-F (张敩方). 1991. The Technique for Plant Chromosome Research (植物染色体研究技术). Harbin: Northeast Forestry University Press. 31–58.

Mergen F, Stairs G R, Snyder E B. 1963. Microsporogenesis in *Pinus echinata* and *Pinus taeda*. Silvae Genetica 12: 127–129.

Moitra A, Bhatnagar S P. 1982. Ultrastructure, cytochemical, and histochemical studies on pollen and male gamete development in gymnosperms. Gamete Research 5 (1): 71–112.

Moitra A. 1980. Cyto- and Histochemical Studies on the Reproductive Structures of Some Gymnosperms. Ph.D. Dissertation. Delhi, India: University of Delhi.

Owens J N, Morris S J, Catalano G L. 1993. How the pollination mechanism and prezygotic and postzygotic events affect seed production in *Larix occidentalis.* Canadian Journal of Forest Research 24: 917–927.

Owens J N, Molder M. 1971. Meiosis in conifers: prolonged pachytene and diplotene stages. Canadian Journal of Botany 49: 2061–2064.

Schorn H E. 1994. A preliminary discussion of fossil larches (*Larix*, Pinaceae) from the Arctic. Quaternary International 22/23: 173–183.

Singh H. 1978. Embryology of Gymnosperms. Berlin, Stuttgart: Gebrüder Borntraeger.

Sterling C. 1963. Structure of the male gametophyte in gymnosperms. Biological Review 38: 167–203.

Villar M, Knox R B, Dumas C. 1984. Effective pollination period and nature of pollen collecting apparatus in the gymnosperm *Larix leptolepis*. Annals of Botany 53: 279–284.

Wang F-H (王伏雄). 1978. The reproductive organs. In: Hu Y-S (胡玉熹), Wang F-H (王伏雄). The *Pinus*—Morphology, Structure, and Development (松属——形态、结构和发育). Beijing: Science Press. 1978.

Yang S-W (杨书文), Wang Q-Y (王秋玉), Xia D-A (夏德安). 1994. Genetic Improvement of *Larix* (落叶松的遗传改良). Harbin: Northeast Forestry University Press.

Yu X-M (俞晓敏), Zhao G-F (赵桂仿). 2003. Microsporogenesis and malegametogenesis of *Larix chinensis* Beissn. Chinese Bulletin of Botany (植物学通报) 20: 576–584.

Zhang X-F (张敩方) , Zhuo L-H (卓丽环), Li M-X (李懋学). 1985. A study on karyotypes of 5 species in *Larix*. Hereditas (Beijing) (遗传) 7 (3): 9–11.